



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή ανάλυση αντιοξειδωτικών βιοδεικτών σε
ιστούς επιμύων που κατανάλωσαν καθαρή πρωτεΐνη
τυρογάλακτος**

**Molecular analysis of antioxidant biomarkers in rats
tissues consuming pure whey protein**

Παπαποστόλου Απόστολος Πορφύριος

M.Sc. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

-Λάρισα 2019-

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
Φυσιολογίας
Ζωϊκών
Οργανισμών



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Ιουνίου – Δεκεμβρίου 2018.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας Γ.Π.Α.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας TBB, ΠΘ.

Αριστείδης Σ. Βεσκούκης: Μεταδιδακτορικός Ερευνητής, TBB, ΠΘ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
3. ABSTRACT	7
4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
4.1. Ελεύθερες ρίζες	9
4.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	10
4.3. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	12
4.4. Οξειδωτικό στρες	14
4.5. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	15
4.6. Πρωτεΐνες του γάλατος	21
4.7. Πρωτεΐνη ορού γάλακτος	22
4.8. Μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος	23
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
5.1. Πειραματικός σχεδιασμός	25
5.2. Προετοιμασία των ιστών	25
5.3. Πρωτόκολλο φωτομετρικού προσδιορισμού της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με χρήση του αντιδραστηρίου Bradford	26
5.4. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηρότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase, GST)	28
5.5. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηρότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GPx)	30
5.6. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηρότητας της περοξειρεδοξίνης (Prx).	33
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
6.1. Δραστηρότητα της GST στο ήπαρ	38
6.2. Δραστηρότητα της GST στον τετρακέφαλο μυ	39
6.3. Δραστηρότητα της GPx στο ήπαρ	40
6.4. Δραστηρότητα της GPx στο σκελετικό μυ	41
6.5. Δραστηρότητα της Prx στο ήπαρ	42
6.6. Δραστηρότητα της Prx στο σκελετικό μυ	43
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΣΕΛΙΔΑ

Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.	11
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες.	15
Εικόνα 3. Σύνθεση της γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμινικό και γλυκίνη.	17
Εικόνα 4. Συνοπτική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων.	20

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Η δραστηριότητα της GST στο ήπαρ.	38
Διάγραμμα 2. Η δραστηριότητα της GST στον τετρακέφαλο μυ.	39
Διάγραμμα 3. Η δραστηριότητα της GPx στο ήπαρ.	40
Διάγραμμα 4. Η δραστηριότητα της GPx στο σκελετικό μυ.	41
Διάγραμμα 5. Η δραστηριότητα της Ptx στο ήπαρ.	42
Διάγραμμα 6. Η δραστηριότητα της Ptx στο σκελετικό μυ.	43

1. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Σ. Χαρουτουνιάν για την συμβολή του στην παρούσα πτυχιακή ως επιβλέπων καθηγητής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το κύριο Δ. Κουρέτα για την εμπιστοσύνη του και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ πάνω στη συγκεκριμένη πτυχιακή στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών καθώς και τον κύριο Α. Βεσκούκη για την σημαντική συμβολή του, στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για την καθοριστική τους βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους αυτής της πτυχιακής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη κατανόηση, βοήθεια και υποστήριξη σε κάθε βήμα της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας μέχρι σήμερα.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey protein) αποτελεί ένα παραπροϊόν της διαδικασίας παρασκευής τυριού και ένα ρυπογόνο απόβλητο όταν αποβάλλεται στο περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, διάφορες μελέτες παγκοσμίως έχουν αναδείξει τον ιδιαίτερα ευεργετικό της ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει πολύ ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, κυρίως διότι προμηθεύει τον οργανισμό με μια πληθώρα αμινοξέων με βασικότερο την κυστεΐνη, το οποίο είναι δομικό συστατικό της γλουταθειόνης, του κυριότερου ενδοκυττάριου αντιοξειδωτικού. Η επίδραση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε ένζυμα υπεύθυνα για την αποτοξικοποίηση του οργανισμού από τα ιδιαίτερα επιβλαβή υπεροξειδία δεν είναι γνωστή. Επομένως, στόχος της παρούσα μελέτης, η οποία αποτελεί μέρος ενός μεγαλύτερου πειράματος, ήταν η διερεύνηση της επίδρασής της στη δραστηριότητα των ενζύμων τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και περοξειρεδοξίνη (Prx) στον τετρακέφαλο μυ και το ήπαρ επιμύων, οι οποίοι κατανάλωσαν πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της GST στο μυ καταδεικνύοντας τη σημαντική προστατευτική της δράση έναντι των υπεροξειδίων. Παράλληλα, εμφανίστηκαν μικρές τάσεις αύξησης στην GST στο ήπαρ και στην GPx και στους δύο ιστούς, ενώ η Prx δεν επηρεάστηκε. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δείχνουν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτίωσε την άμυνα των ιστών που εξετάστηκαν απέναντι στα υπεροξειδία στο βαθμό που αυτό απαιτούνταν. Το παρόν πείραμα αποτελεί κομμάτι μίας μεγαλύτερης πειραματικής παρέμβασης του εργαστηρίου μας, τα αποτελέσματα της οποίας καταδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στους κυριότερους ιστούς επιμύων. Αυτό σημαίνει ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί της πρώτης γραμμής άμυνας (π.χ. καταλάση, γλουταθειόνη) ενισχύθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε τα ένζυμα που μετρήσαμε σε αυτή τη μελέτη να μην υπάρχει ανάγκη να ενεργοποιηθούν περαιτέρω. Τελικά, σε συνδυασμό και με ευρήματα άλλων σχετικών μελετών φαίνεται ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος είναι ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο προϊόν, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιοξειδωτική ενίσχυση του οργανισμού και να πάψει να αποτελεί ρύπο για το περιβάλλον.

3. ABSTRACT

Whey protein is a by product of cheese industry and a harmful waste for the environment. However, recent studies have stressed its beneficial action on human health. In particular, it has been reported that whey protein possesses potent antioxidant properties since it provides cysteine, one of the structural amino acids of glutathione, the most important cellular antioxidant molecule. The effects of whey protein on the enzymes that scavenge harmful peroxides have not yet been elucidated. Therefore, the aim of the present study, which is a part of a larger experimental approach, was to examine the effects of whey protein on quadriceps muscle and liver glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxin (Prx) of rats fed with it (1 g/kg body weight/day) for 28 days. According to our results, GST activity was increased in muscle. Furthermore, a moderate trend for increased GST activity in liver and GPx activity in both tissues was observed, whereas Prx was not affected. This study indicates that whey protein enhanced the antioxidant defence of the tested tissues. However, there was no need to further activate the detoxifying enzymes measured since, previous studies of our group have shown that it activates the antioxidant mechanisms belonging to the first line of defence (i.e., catalase and glutathione). In conclusion, whey protein appears to be a promising agent that can be used for the reinforcement of antioxidant defence and, thus, reduce the pollution burden of the environment.

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη δραστικότητα τριών ενζύμων (GST, GPx, Prx) που αδρανοποιούν υπεροξείδια στο ήπαρ και το σκελετικό μυ επιμύων.

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1. Ελεύθερες ρίζες

Ένα μόριο ή ένα άτομο για να θεωρείται ελεύθερη ρίζα πρέπει να έχει ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους του (1) και αυτό μπορεί να συμβεί με απώλεια ή πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου (2). Τα μόρια των ελευθέρων ριζών λόγω της διαμόρφωσής τους είναι πολύ ασταθή με αποτέλεσμα να αντιδρούν σχεδόν άμεσα με τα βιομόρια, οδηγώντας τα σε οξείδωση, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την λειτουργία τους αλλά και γενικότερα τις φυσικές λειτουργίες των οργανισμών. Παρά τις αρνητικές τους επιδράσεις έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχουν και σε κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τον οργανισμό (π.χ. σηματοδότηση, άμυνα κ.α.).

Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια, ενώ η πιο απλή από αυτές είναι το άτομο του υδρογόνου (ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο).

Σύμφωνα με το κεντρικό τους άτομο μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τις ελεύθερες ρίζες ως εξής:

- Οξυγόνο - Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)
- Άζωτο - Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)
- Θείο - Δραστικές Μορφές Θείου (Reactive Sulphur Species, RSS)
- Χλώριο - Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCIS)

Έχει βρεθεί ότι αντιδράσεις με τις ROS οι οποίες και απαντώνται συνηθέστερα στους οργανισμούς μπορούν να οδηγήσουν στις 3 άλλες κατηγορίες (3). Ειδικότερα στις ROS συγκαταλέγονται οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}) καθώς και μη ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), το όζον (O_3) και τέλος το μονήρες οξυγόνο (1O_2).

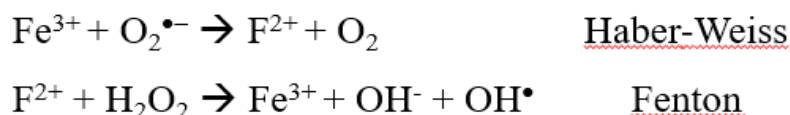
4.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές.

Ενδογενείς πηγές

Το μεγαλύτερο ποσοστό ελευθέρων ριζών ενδογενώς παράγεται στα μιτοχόνδρια και ειδικότερα στην εσωτερική τους μεμβράνη κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (4) (Εικόνα 1). Από την αναπνευστική αλυσίδα μπορούν να ξεφύγουν ορισμένα ηλεκτρόνια κατά την παραγωγή του ATP με αποτέλεσμα να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόνων. Εφόσον αυτό που καταναλώνεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι το O_2 το μεγαλύτερο ποσοστό ελευθέρων ριζών που παράγονται ανήκουν στις ROS. Κύριες θέσεις δημιουργίας $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 αποτελούν η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης (σύμπλοκο I) καθώς και η αναγωγή του κυτοχρώματος (σύμπλοκο II) (5). Φαίνεται ότι το H_2O_2 παράγεται με μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη ενώ από την μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγεται $O_2^{\bullet-}$ (3). Το $O_2^{\bullet-}$ στην συνέχεια ανάγεται σε H_2O_2 μέσω της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (Mn-SOD).

Οι δύο αυτές ROS παρουσία σιδήρου και μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου, όπως φαίνεται παρακάτω.



Μία εναλλακτική ενδογενής πηγή παραγωγής ROS και κυρίως του H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδιοσώματα μέσω των ενζύμων που περιέχουν και τα οποία στοχεύουν στην καταστροφή επιβλαβών ουσιών για το κύτταρο μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Στα μικροσώματα του ήπατος μπορούν να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες μέσω των αντιδράσεων του κυτοχρώματος P-450(6). Τα

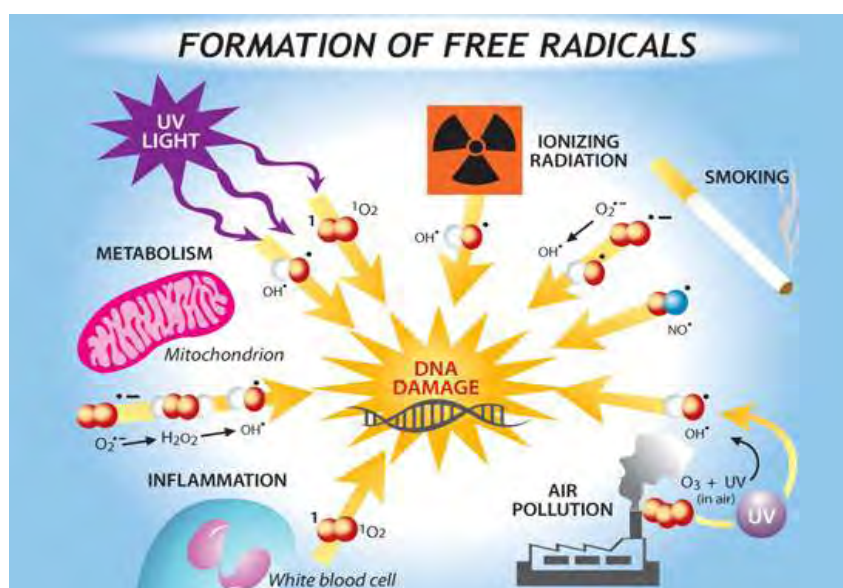
κυτοχρώματα έχουν καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό δράσης τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, όπως φαίνεται στην κάτωθι αντίδραση.



Τέλος τα ενεργοποιημένα μακροφάγα – ουδετερόφιλα καθώς και οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν εν δυνάμει να αποτελέσουν σημαντικές ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών (7).

Εξωγενείς πηγές

Σημαντικοί εξωγενείς οξειδωτικοί παράγοντες θεωρούνται η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός από το τσιγάρο, το όζον και τα απόβλητα βιομηχανιών (8,9). Επιπλέον, ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από τη χρήση φαρμάκων (10,11) καθώς και άλλων ξενοβιοτικών ουσιών όπως εντομοκτόνων, τοξινών αλλά και μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Τέλος οι κακές διατροφικές συνήθειες φαίνεται ότι αποτελούν μια ακόμα σημαντική πηγή παραγωγής εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων (12,13) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

4.3. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Αν και συνήθως συσχετίζουμε τις ελεύθερες ρίζες μόνο με αρνητικά για τον οργανισμό αποτελέσματα, είναι αποδεδειγμένο ότι κατέχουν διττό ρόλο (12). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι λειτουργούν θετικά για τον οργανισμό διότι είναι αναγκαίες για ουσιώδεις διαδικασίες των κυττάρων. Από την άλλη όταν οι συγκεντρώσεις τους ξεπερνούν τις φυσιολογικές τιμές, σε βαθμό που είναι αδύνατον να αντισταθμιστούν από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, φαίνεται να προκαλούνται σημαντικές βλάβες και αλλοιώσεις σε κύρια βιομόρια.

Θετικές επιδράσεις

Πολλές ελεύθερες ρίζες και ειδικότερα οι ROS συμμετέχουν στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των αντιγόνων κατά τη διαδικασία της φαγοκύττωσης (1) καθώς και έναντι των φλεγμονών, που ενδέχεται να εμφανιστούν για διάφορους λόγους όπως εξαιτίας ενός μυϊκού τραυματισμού μετά από έντονη άσκηση (14). Επιπρόσθετα, πολλές φορές οι ελεύθερες ρίζες έχοντας ρόλο μορίων σηματοδότησης συμμετέχουν στην διακυτταρική επικοινωνία (15) την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μυϊκή σύσπαση και τέλος την έκφραση γονιδίων (16). Η διακοπή της παραγωγής των ROS ακολουθείται από απώλεια μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS οδηγεί σε εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές επιδράσεις

Εκτός των θετικών επιδράσεων, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, οι ROS έχουν ορισμένες σημαντικά αρνητικές επιδράσεις καθώς διαφοροποιούν το σχήμα και το μέγεθος των μορίων με τα οποία αντιδρούν (17). Κατά αυτόν τον τρόπο μπορούν να επάγουν τα αποπτωτικά μονοπάτια σε υγιή κύτταρα, να οδηγήσουν σε φλεγμονές και γενικότερα να τροποποιήσουν ορισμένες κυτταρικές λειτουργίες. Όλα τα παραπάνω μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ορισμένων εκφυλιστικών ασθενειών και καταστάσεων, όπως η νόσος του Parkinson, ο καταρράκτης, η νόσος του Alzheimer, ο καρκίνος και η γήρανση (18). Επιπρόσθετα, οι ROS οξειδώνουν τα βασικά βιολογικά μακρομόρια όπως τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA.

▪ **Λιπίδια**

Από όλα τα μακρομόρια, τα πιο ευαίσθητα σε οξειδωτική καταστροφή είναι τα λιπίδια. Η παρουσία ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό περιβάλλον που δημιουργούν στο κύτταρο οδηγούν σε σχηματισμό πολύ ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFA). Η παραπάνω διαδικασία είναι γνωστή ως λιπιδική υπεροξείδωση και τα ασταθή αυτά προϊόντα διασπώνται με αποτέλεσμα να προκύπτουν ρίζες περοξυλίου $\text{ROO}\cdot$, συζυγή διένια και μηλονική διαλδεϋδη (MDA). Βασικά δομικά στοιχεία των κυττάρων αλλά και των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Κατά αυτόν τον τρόπο η καταστροφή των PUFA οδηγεί σε αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας των μεμβρανών με συχνό συνήθως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, οι ROS έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις λιποπρωτεΐνες και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (19).

▪ **Πρωτεΐνες**

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν δομικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να οδηγούν σε τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας τους. Τα αποτελέσματα της οξείδωσης αυτής είναι η παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, τα οποία τα χρησιμοποιούμε συχνά ως βιοδείκτες για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες. Μια σημαντική κυτταρική επίπτωση που μπορεί να έχει η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών είναι η απώλεια της ενζυμικής τους λειτουργίας. Έχει παρατηρηθεί ότι η αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών γίνεται από τα λυσοσώματα και το πρωτεόσωμα. Ενώ, αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι τα μεγάλου μοριακού βάρους καρβονύλια δεν ανοικοδομούνται με αποτέλεσμα να γίνεται συσσώρευσή τους με δημιουργία συσσωματωμάτων (20).

▪ **DNA**

Αν και το DNA γενικά θεωρείται ένα μόριο αρκετά σταθερό, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν μαζί του και να του προκαλούν σοβαρές

βλάβες (οξειδωτική καταστροφή). Συνηθέστερα, οι βλάβες που προκαλούνται αφορούν τροποποιήσεις βάσεων, απώλεια πουρινών, δημιουργία θραυσμάτων στις έλικές του, αλλαγές στα σάκχαρα των δεοξυριβοζών και βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι η συσσώρευση καθώς και η πρόκληση νέων μεταλλάξεων που τελικώς ενδέχεται να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (21).

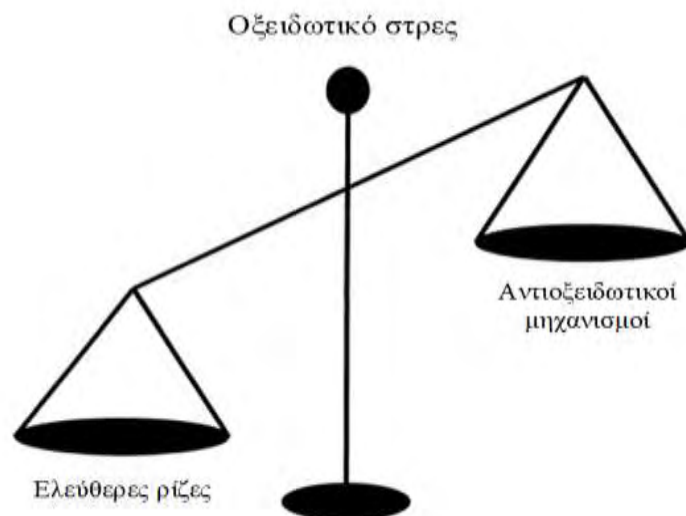
4.4. Οξειδωτικό στρες

Αναφερόμενοι στο οξειδωτικό στρες σύμφωνα με τον Sies, αναφερόμαστε σε μια κατάσταση σημαντικής διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (22) όπου η ποσότητα των ελευθέρων ριζών δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί συνολικά, από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού (Εικόνα 2). Σήμερα, ωστόσο, ο ορισμός του οξειδωτικού στρες έχει αλλάξει. Έτσι, σύμφωνα με τον νέο ορισμό του Jones το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (23). Το οξειδωτικό στρες πέραν μιας παροδικής κατάστασης η οποία μπορεί να είναι φυσιολογική για έναν οργανισμό, όταν συνεχιστεί για μεγάλο χρονικό διάστημα φαίνεται να προκαλεί βλάβες στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια, στο DNA και ορισμένες φορές να επιφέρει ακόμα και τον κυτταρικό θάνατο.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί στο οργανισμό τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες όπως:

- ο αερόβιος μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια
- η δράση ενζύμων (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης)
- η δράση των λευκοκυττάρων
- οι υψηλές συγκεντρώσεις O_2
- το όζον
- η ακτινοβολία
- το κάπνισμα
- η διατροφή
- οι παθογόνοι μικροοργανισμοί

- οι ξενοβιοτικές ουσίες και τα φάρμακα



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

4.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Με τον όρο αντιοξειδωτικό εννοούμε οποιαδήποτε ουσία, η οποία αν βρεθεί σε μικρή συγκέντρωση αναφορικά με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα είναι ικανή να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (12). Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά. Κύριες ιδιότητές τους είναι ότι δύνανται να αποτρέπουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών ή να οδηγούν σε αδρανοποίησή τους με παράλληλη μετατροπή τους σε χαμηλότερης δραστηριότητας μόρια και, τέλος, συμβάλλουν στην επιδιόρθωση βλαβών επαγόμενων από ελεύθερες ρίζες.

Αντιοξειδωτικά με μη ενζυμικό μηχανισμό δράσης

Στα αντιοξειδωτικά αυτά συγκαταλέγονται μη ενζυμικοί μεταβολίτες και ορισμένοι από αυτούς είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η βιταμίνη E, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη και το σελήνιο.

➤ **Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)**

Η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ ανήκει στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες και θεωρείται ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια διότι είναι ικανό να εξουδετερώνει ταχύτατα τις δραστικές μορφές οξυγόνου (12).

➤ **Βιταμίνη E**

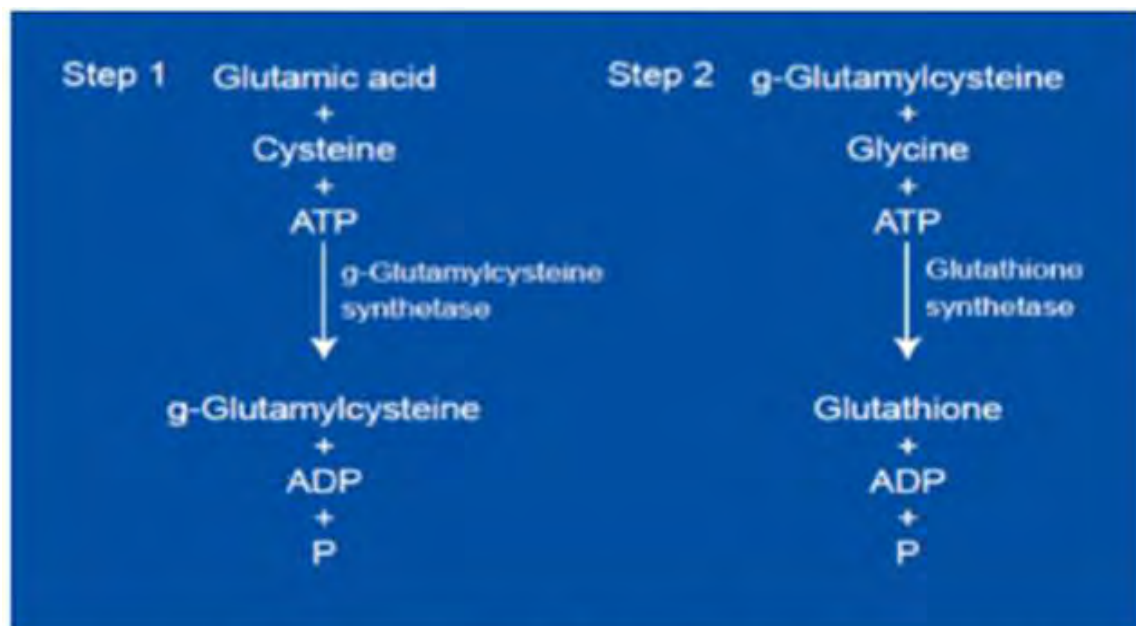
Η βιταμίνη E που εντοπίζεται στις κυτταροπλασματικές καθώς και στις μιτοχονδριακές μεμβράνες προσφέρει κυρίως προστασία στη βιταμίνη A και τα λιπίδια από την οξείδωση λόγω των ROS. Ανήκει στις λιποδιαλυτές βιταμίνες και αποτελείται από πληθώρα τοκοφερολών. Μια από τις πιο δραστικές αλλά και πιο άφθονες τοκοφερόλες είναι η α-τοκοφερόλη (12).

➤ **Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ ως μόριο αποτελεί το τελευταίο βήμα στο μονοπάτι μεταβολισμού των πουρινών. Κατά την έντονη σωματική δραστηριότητα η συγκέντρωση του ουρικού οξέος αυξάνεται στο αίμα (24). Μέσου αυτής της οδού διαχέεται στα κύτταρα των μυών προσφέροντάς τους προστασία έναντι της οξείδωσης από τις ROS.

➤ **Γλουταθειόνη**

Το πιο σημαντικό ενδογενές, μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μόριο που αποτελείται από τρία διαφορετικά αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη) (Εικόνα 3). Ανήκει στα υδατοδιαλυτά μόρια και έχει πρωταρχικό ρόλο την προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτικές βλάβες. Το στοιχείο που την καθιστά ως ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά είναι η ικανότητά της να ανακυκλώνεται συνεχώς από την οξειδωμένη της μορφή προς την ανηγμένη και το αντίθετο. Μόνο σε μια από τις δύο αυτές μορφές οφείλει τις αντιοξειδωτικές της ικανότητες και αυτή είναι η ανηγμένη (GSH) (12). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η ανηγμένη γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να ανάγει τα οργανικά υπεροξειδία και το υδρογόνο μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο της GPx



Εικόνα 3. Σύνθεση της γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμινικό και γλυκίνη

➤ Σελήνιο

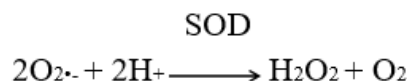
Το σελήνιο ανήκει στην κατηγορία των μετάλλων ιχνοστοιχείων και συμβάλλει στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών. Ο χαρακτηρισμός του ως αντιοξειδωτικού οφείλεται στην λειτουργία του ως συμπαραγοντας της GPx.(12).

Αντιοξειδωτικά με ενζυμικό μηχανισμό δράσης

Στα αντιοξειδωτικά αυτά συγκαταλέγονται ενζυμικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές δράσεις και ορισμένα από αυτά είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase. SOD), η καταλάση (Catalase. CAT), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase. GR), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase. GPx), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase. GST) και οι περοξειρεδοξίνες (Peroxiredoxins).

➤ Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

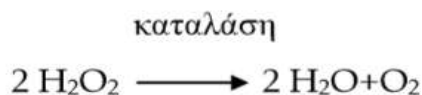
Η υπεροξειδική δισμουτάση αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και βρίσκεται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς καταλύοντας την κάτωθι αντίδραση.



Γνωρίζουμε ότι η ρίζα σουπεροξειδίου παράγεται ως παραπροϊόν κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μπορεί να αναχθεί είτε από την SOD που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, είτε από την SOD που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα προς υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανάλογα με το εάν εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ή στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα (25).

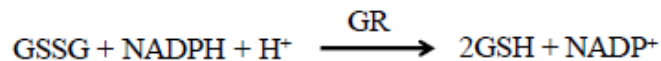
➤ Καταλάση (CAT)

Η καταλάση εντοπίζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιδιαίτερα στα υπεροξειδισώματα τα οποία βοηθούν στην αποτοξικοποίηση των κυττάρων μέσω της κατάλυσης της αντίδρασης μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (όταν αυτό βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις) σε νερό και οξυγόνο όπως καταδεικνύεται και στην κάτωθι αντίδραση (26).



➤ Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

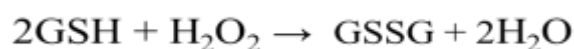
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η γλουταθειόνη αποτελεί ένα πολύ βασικό στοιχείο για τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου αλλά και του οργανισμού γενικότερα. Το ένζυμο που παίζει καθοριστικό ρόλο στη δράση της γλουταθειόνης ενδοκυτταρικά είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης καθώς ανακυκλώνει τις δύο μορφές της γλουταθειόνης κρατώντας μια φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στην οξειδωμένη (GSSG) και την ανηγμένη (GSH) μορφή της, ανάγοντας πάντα την GSSG προς GSH. Το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) αποτελεί απαραίτητο στοιχείο του ενεργού κέντρου της GR καθώς μέσω αυτών και των φωσφορυλιωμένων μορφών τους και του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδου (NADPH) πραγματοποιείται η κάτωθι αντίδραση.



Το FAD ανάγεται από το NADPH και μεταφέρει τα e^- του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια GSSG. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δύο μόρια GSH (ενεργό αντιοξειδωτικό) καθώς και δύο σουλφυδρυλομάδες.

➤ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι τετραμερές ένζυμο, μέλος μιας υπεροικογένειας ενζύμων τα οποία έχουν μια σελενοκυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο. Έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς αναστέλλουν τη λιπιδική οξείδωση μειώνοντας τα λιπιδικά υπεροξείδια στις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Η κύρια αντίδραση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι να εξουδετερώνει υπεροξείδια του υδρογόνου (H_2O_2) αλλά και άλλα υπεροξείδια αντιδρώντας με το νερό σύμφωνα με την κάτωθι αντίδραση.



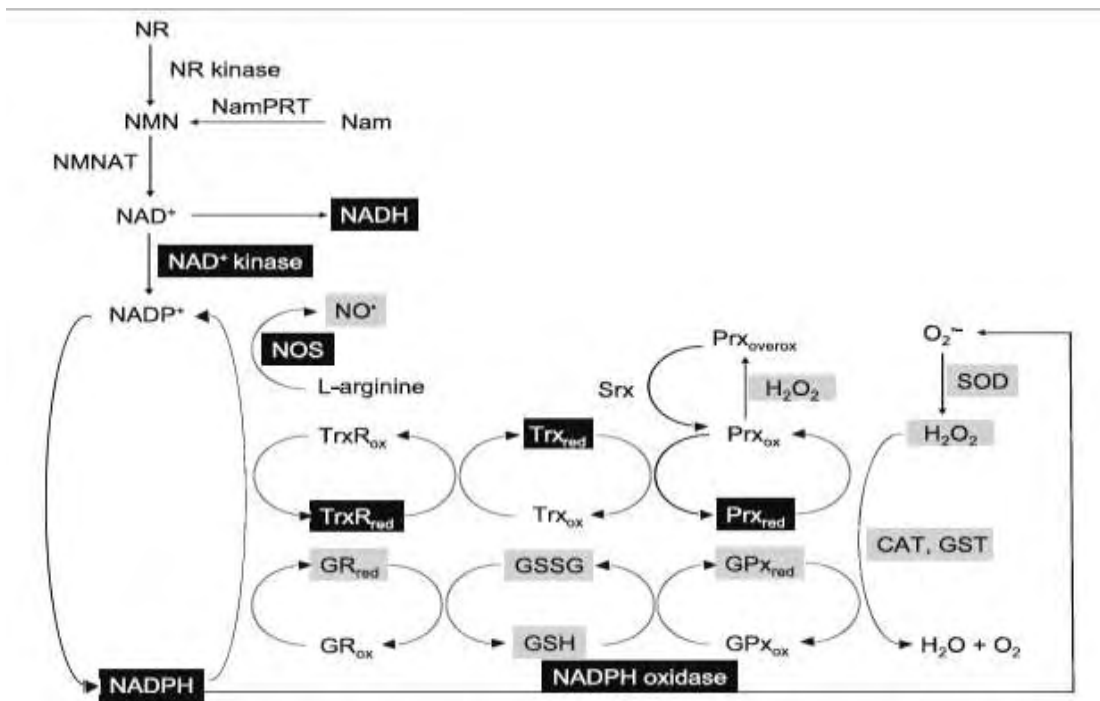
Το κατάλοιπο της σελενοκυστεΐνης συμμετέχει άμεσα στη δωρεά ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα (υπεροξείδιο) και οξειδώνεται κατά τη διαδικασία. Το ένζυμο στη συνέχεια χρησιμοποιεί την GSH ως δότη ηλεκτρονίων για την αναγέννηση της σεληνοκυστεΐνης με την ταυτόχρονη οξείδωσή της σε GSSG. Η ενζυμική δράση της GPx ενεργοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 ενώ από την άλλη η καταλάση φαίνεται να ενεργοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (12).

➤ Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Το ένζυμο της S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης σχετίζεται με την αποτοξικοποίηση ενός μεγάλου φάσματος ενώσεων καθώς και με την ελάττωση της βλάβης, που προκαλείται από τη δημιουργία των ελευθέρων ριζών στα ερυθροκύτταρα. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και μία από τις δράσεις του είναι να συνδέεται και να μεταφέρει την γλουταθειόνη (27).

➤ **Περιοξείρεδοξίνες (Prxs)**

Οι περοξειρεδοξίνες είναι μια οικογένεια κυστεϊνο-εξαρτώμενων υπεροξειδασών οι οποίες αντιδρούν με H_2O_2 , αλειφατικά και αρωματικά υπεροξειδικά υποστρώματα καθώς και με υπεροξυνιτρίτη (28). Αποτελούν το 1% ή και περισσότερο των κυτταρικών πρωτεϊνών στα ζώα και έχει προταθεί ότι είναι υπεύθυνες για την αναγωγή του 99% των κυτταροπλασματικών υπεροξειδίων καθώς επίσης και του 90% των μιτοχονδριακών υπεροξειδίων στους ανθρώπους. Επιπλέον, οι περοξειρεδοξίνες συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα των θηλαστικών. Στην Εικόνα 4 φαίνεται το δίκτυο το οποίο σχηματίζουν οι προαναφερθέντες καθώς και άλλοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου.



Εικόνα 4. Συνοπτική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων(29) **NADH**: Ανηγμένο Νικοτιναμίδο-Αδενινο-Δινουκλεοτίδιο, **NAD⁺**: Οξειδωμένο Νικοτιναμίδο-Αδενινο-Δινουκλεοτίδιο, **NADPH**: Ανηγμένο Φωσφορικό Νικοτιναμίδο-Αδενινο-Δινουκλεοτίδιο, **NADP⁺**: Οξειδωμένο Φωσφορικό Νικοτιναμίδο-Αδενινο-Δινουκλεοτίδιο, **NR**: Ριβοζίτης Νικοτιναμιδίου, **NR kinase**: Κινάση του Ριβοζίτη Νικοτιναμιδίου, **NMN**: Νικοτιναμιδικό Μονονουκλεοτίδιο, **NamPRT**: Νικοτιναμίδιο Φωσφοριβοσυλ-Τρανσφεράση, **Nam**: Νικοτιναμίδιο, **NMNAT**: Νικοτιναμιδικό Μονονουκλεοτίδιο Αδένυλο- Τρανσφεράση, **GRred**: Ανηγμένη μορφή της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης, **GRox**: Οξειδωμένη μορφή της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης, **GPxred**: Ανηγμένη μορφή της Υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, **GPxox**: Οξειδωμένη μορφή της Υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, **GST**: Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης, **CAT**: Κατάλυση, **SOD**: Υπεροξειδική Δισμουτάση, **GSH**: Ανηγμένη Γλουταθειόνη, **GSSG**: Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, **Prx_{red}**: Ανηγμένη μορφή των Περοξειρεδοξινών, **Prx_{ox}**: Οξειδωμένη μορφή των Περοξειρεδοξινών, **Prx_{overx}**: Υπεροξειδωμένη μορφή των Περοξειρεδοξινών, **Trx_{red}**: Ανηγμένη μορφή της Θειορεδοξίνης, **Trx_{ox}**: Οξειδωμένη μορφή της Θειορεδοξίνης, **TrxR_{red}**: Ανηγμένη μορφή της Αναγωγάσης της Θειορεδοξίνης, **TrxR_{ox}**: Οξειδωμένη μορφή της Αναγωγάσης της Θειορεδοξίνης, **Srx**: Σουλφιρεδοξίνη, **NO•**: Νιτρικό Οξύ, **NOS**: Συνθάση του Νιτρικού Οξέος

4.6. Πρωτεΐνες του γάλακτος

Τα συστατικά που περιέχονται στο γάλα τον τελευταίο καιρό χαρακτηρίζονται ως βιολειτουργικά τρόφιμα, υποδηλώνοντας ότι η ευρεία χρήση τους έχει άμεσες και μετρήσιμες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου (30). Στο εμπόριο οι πρωτεΐνες του γάλακτος μπορούν να βρεθούν ως πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey protein), πρωτεΐνες του πλήρους γάλατος, καθώς και ως καζεϊνικά άλατα. Η σύσταση της πρωτεΐνης γάλακτος ανέρχεται περίπου σε 80% καζεϊνικών πρωτεϊνών (α, β, c, υπότυποι) και ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 20% αποτελείται από πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (β-γαλακτοσφαιρίνες, λακτοφερρίνες, αλβουμίνη ορού, α-λακταλβουμίνες, λακτοϋπεροξειδάσες, ανοσοσφαιρίνες)

Έχοντας ως βάση το αποβουτυρωμένο γάλα με τη διαδικασία της όξινης κατακρημνίσεως ή με χρήση ενζύμων μέσω ενζυμικής πήξης, πλύσης και ξήρανσης παράγεται η καζεΐνη. Με επεξεργασία του τυροπήγματος καζεΐνης με βασικά άλατα όπως το NaOH ή το $\text{Ca}(\text{OH})_2$ παράγονται τα καζεϊνικά άλατα του Na ή του Ca, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα των καζεϊνικών αλάτων σε πρωτεΐνη ανέρχεται περίπου στο 90%. Η συμπύκνωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος που συμβαίνει μετά το πήξιμο του γάλακτος από τα ένζυμα της πυτιάς ή μέσω οξέων, επάγει το διαχωρισμό του ορού γάλακτος από το τυρόπηγμα. Στη συνέχεια, με επιπλέον υπερδιήθηση και διαδικασίες ξήρανσης μπορούν να παραχθούν συμπυκνώματα ορού γάλακτος με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες κυμαινόμενες από 20% έως 80%. Τέλος, με περαιτέρω επεξεργασία ενδέχεται να οδηγηθούμε σε παραγωγή απομονωμένων στελεχών πρωτεΐνης ορού γάλακτος με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μεγαλύτερη του 95% και με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και λακτόζη.

Ενώ και οι καζεΐνες αλλά και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος χαρακτηρίζονται ως υψηλής αξίας πρωτεΐνες μόνο η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ανταποκρίνεται σε υψηλή περιεκτικότητα σε BCAAs καθώς και επιπρόσθετων αμινοξέων (31). Επιπλέον, η καζεΐνη μετά από πρόσληψή της μέσω των γαλακτοκομικών, απελευθερώνεται με πιο αργούς ρυθμούς οδηγώντας σε μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης αμινοξέων. Σύμφωνα με μια σχετική έρευνα φαίνεται ότι ο διαφορετικός ρυθμός πέψης των πρωτεϊνών ή η διαφορά στην αποδέσμευση των αμινοξέων μπορεί να έχει ως συνέπεια τον διαφορετικό ρυθμό διάσπασης ή πρωτεϊνοσύνθεσης (32).

Ο ορός γάλακτος, στην εποχή μας, αποτελεί ένα ευρέως γνωστό και πολυχρησιμοποιούμενο διατροφικό συμπλήρωμα πρωτεϊνών, το οποίο πέραν της πολυσυζητημένης δράσης του στη μυϊκή αποκατάσταση στο χώρο του αθλητισμού εικάζεται ότι δρα προστατευτικά έναντι των μικροβίων, βοηθάει στο ανοσοποιητικό σύστημα, έχει μερικώς αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλει στην πρόληψη παθήσεων όπως η οστεοπόρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα(33).

4.7. Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (ή ορός γάλακτος)

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούσαμε τον ορό γάλακτος ως βιομηχανικό απόβλητο λόγου του τρόπου παρασκευής του, δηλαδή ως ένα παραπροϊόν της παραγωγικής διαδικασίας των τυριών. Αξιοσημείωτο είναι πως οι άνθρωποι φαίνεται ότι είχαν αντιληφθεί από τα αρχαία ακόμα χρόνια τις θετικές ιδιότητες αυτού του σύγχρονου αποβλήτου με τον Ιπποκράτη να αναφέρεται πρώτος σε αυτό, επικροτώντας τις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια των Μεσαιωνικών χρόνων ο ορός γάλακτος έφτασε στο σημείο να θεωρείται όχι μόνο φάρμακο, αλλά και ίσως ένα βάλσαμο για την επιδερμίδα. Ιστορικά, το χρησιμοποιούσαν συστηματικά ως βασικό συστατικό για να παρασκευάζουν φίλτρα και αλοιφές τις οποίες χρησιμοποίησαν για να καταπραΰνουν τους πόνους των εγκαυμάτων, αλλά και ως θεραπεία διάφορων άλλων ασθενειών (34).

Στην σύγχρονη πλέον εποχή η κατανόηση της ιδιότητας του ορού γάλακτος ως ενός νέου βιολειτουργικού τροφίμου άλλαξε άρδην την αντίληψή μας περί της ιδέας του παραπροϊόντος και το αναβάθμισε σε “συν-προϊόν” της παρασκευαστικής διαδικασίας του τυριού (35).

Ο ορός γάλακτος αποτελείται από τα κάτωθι συστατικά:

- β-λακτοσφαιρίνες
- α-λακταλβουμίνες
- αλβουμίνη ορού
- λακτοφερρίνη
- ανοσοσφαιρίνες
- λακτόζη
- γλυκομακροπεπίδια
- ένζυμα της λακτουπεροξειδάσης (35)

Θετικές επιδράσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος

Φαίνεται ότι ο ορός γάλακτος έχει την ικανότητα να δρα ως αντιοξειδωτικό, αντιυπερτασικό, αντικαρκινικό, αντιϊκό, αντιβακτηριακό καθώς και ως χηλικός παράγοντας. Ένας από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς με τον οποίο πιστεύουμε ότι ο ορός γάλακτος επιδρά ενδοκυτταρικά είναι με τη μετατροπή των κυστεϊνών σε ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που εντοπίζεται ενδοκυτταρικά, τη γλουταθειόνη. Σε κλινικές έρευνες ο ορός γάλακτος έχει εφαρμοστεί σε θεραπείες καρκίνου, όπου επίμυες οι οποίοι τράφηκα με πρωτεΐνη ορού γάλακτος εμφάνισαν στο έντερο σημαντικά λιγότερους καρκίνους σε σχέση με επίμυες οι οποίοι δεν συμπεριελάμβαναν στην διατροφή τους τις πρωτεΐνες τυρογάλακτος (36). Επιπροσθέτως η πρωτεΐνη ορού γάλακτος εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα στην άσκηση (37).

4.8. Μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος

Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές δράσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος πιθανολογείται ότι οφείλονται στη συνεισφορά της σε πρωτεϊνικά πεπτίδια πλούσια σε κυστεΐνη, τα οποία συνεργούν στην παραγωγή ενός πολύ ισχυρού ενδοκυττάριου αντιοξειδωτικού, όπως προαναφέρθηκε, της γλουταθειόνης (35). Τα τρία αμινοξέα τα οποία απαρτίζουν την γλουταθειόνη είναι η γλυκίνη, το γλουταμινικό και η κυστεΐνη. Αυτό που φαίνεται να βοηθάει προληπτικά κατά της οξείδωσης και των βλαβών που δημιουργούνται στους ιστούς είναι οι ομάδες θειόλης που περιέχονται στις κυστεΐνες και οι οποίες χρησιμεύουν ως δραστικοί αναγωγικοί παράγοντες. Γνωρίζοντας ότι η

γλουταθειόνη δρα ως αντιοξειδωτικό στην ανηγμένη μορφή της κατανοούμε γιατί η ριβοφλαβίνη, το νιασιναμίδιο και η GR θεωρούνται σημαντικά μόρια, αφού έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία αναγωγής της γλουταθειόνης (38). Ως ένα ακόμα ένζυμο το οποίο εντοπίζεται ενδοκυτταρικά και συνδράμει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού η GPx αποτελείται από κυστεΐνη και το ιχνοστοιχείο σελήνιο, ανάγει τα δραστικά λιπιδικά υπεροξείδια σε χαμηλότερης δραστικότητας μόρια απενεργοποιώντας το οξειδωτικό τους δυναμικό.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 12 αρρενες επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας (6 μηνών) με μέσω σωματικό βάρος 470g. Τα ζώα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες (6 επίμυες / ομάδα) και ακολούθησαν συγκεκριμένη διατροφή αντίστοιχα με την ομάδα που ανήκαν για 28 ημέρες.

- Η ομάδα ελέγχου τράφηκε με την πρότυπη εμπορική διατροφή (καλαμπόκι, πίτουρο, κριθάρι, αλεύρι σόγιας, πάστα γάλακτος, μελάσσα) η οποία αγοράστηκε από τη Viozois S.A. (Ιωάννινα).
- Η πειραματική ομάδα τράφηκε με την πρότυπη εμπορική διατροφή συν αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος (1 g / kg σωματικού βάρους / ημέρα) διαλυμένη στο νερό που έπιναν. Έγιναν προκαταρκτικά πειράματα για να ελεγχθεί η ποσότητα του νερού που κατανάλωναν καθημερινά ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα ζώα λάμβαναν την επιθυμητή ποσότητα τροφής. Η υγεία των ζώων παρατηρούνταν καθημερινά.

Μετά το πέρας των 28 ημερών τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με διαιθυλαιθέρα και υπέστησαν ευθανασία με αποκεφαλισμό υπό βαθιά αναισθησία. Το ήπαρ και ο τετρακέφαλος μυς αποκόπηκαν, καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι την ημέρα των αναλύσεων.

5.2. Προετοιμασία των ιστών

Οι ιστοί αποψύχθηκαν και 400 mg από το κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκαν αντίστοιχα σε 800 μl διάλυμα ομογενοποίησης (PBS 0,01 M, pH=7,4), το οποίο περιείχε ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete™ mini protease inhibitors). Έπειτα, έγινε σύντομη επεξεργασία των δειγμάτων με υπερήχους (3×10 sec) για καλύτερη ομογενοποίηση. Σε όλη την διαδικασία της ομογενοποίησης οι ιστοί βρίσκονταν μέσα σε πάγο. Στην συνέχεια το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε (15.000 g, 5 min, 4°C), συλλέχθηκε το υπερκείμενο και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την ημέρα της ανάλυσης.

5.3. Πρωτόκολλο φωτομετρικού προσδιορισμού της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με χρήση του αντιδραστηρίου Bradford.

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (39). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου ανάμεσα στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 και στις υπάρχουσες πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα. Η συγκεκριμένη χρωστική (παρουσία φωσφορικού οξέος και μεθανόλης) μπορεί να υπάρχει σε δυο διαφορετικά χρώματα, μπλε και κόκκινο. Το κόκκινο χρώμα μετατρέπεται σε μπλε όταν συμπλοκοποιηθεί η χρωστική με τις πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο αυτό απορροφά στα 595nm.

Πειραματική διαδικασία

Αραιώνουμε το δείγμα σε αναλογία 1:20 (προσθέτουμε 10 μ l από το δείγμα σε 190 μ l dH₂O). Προσθέτουμε σε σωληνάρια eppendorf τα κάτωθι αντιδραστήρια.

	Τυφλό	Δείγμα
dH ₂ O	20 μ l	-
Ομογενοποιημένος ιστός - Δείγμα	-	20 μ l
Αντιδραστήριο Bradford	1000 μ l	1000 μ l

Ανακινούμε τα σωληνάρια eppendorf στο vortex και τα αφήνουμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, μηδενίζουμε την απορρόφηση με το τυφλό και μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων eppendorf σε κυψελίδα όπου μετράμε την απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται από την εξίσωση που προκύπτει από μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς που δημιουργούμε με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin).

Πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης βόειου ορού

Φτιάχνουμε ένα αρχικό πυκνό διάλυμα αλβουμίνης με συγκέντρωση 10 mg/ml. Αραιώνουμε αυτό το στοκ ώστε να προκύψουν 7 διαλύματα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις: 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml και 1,4 mg/ml

0,05 mg/ml (1): Αραίωση 1/200 (5 μ l από το πυκνό σε 995 μ l dH₂O)

0,1 mg/ml (2): Αραίωση 1/100 (10 μ l από το πυκνό σε 990 μ l dH₂O)

0,2 mg/ml (3): Αραίωση 1/50 (20 μ l από το πυκνό σε 980 μ l dH₂O)

0,4 mg/ml (4): Αραίωση 1/25 (40 μ l από το πυκνό σε 960 μ l dH₂O)

0,8 mg/ml (5): Αραίωση 1/12,5 (80 μ l από το πυκνό σε 920 μ l dH₂O)

1 mg/ml (6): Αραίωση 1/10 (100 μ l από το πυκνό σε 900 μ l dH₂O)

1,4 mg/ml (7): Αραίωση 1/7 (140 μ l από το πυκνό σε 860 μ l dH₂O)

Προσθέτουμε σε σωληνάρια eppendorf τα παρακάτω αντιδραστήρια

	Τυφλό	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
dH ₂ O	20 μ l	-	-	-	-	-	-	-
Διάλυμα BSA	-	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Αναμιγνύουμε τα αντιδραστήρια και τα αφήνουμε να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, μηδενίζουμε την απορρόφηση με το τυφλό και μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 595nm.

5.4. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase, GST).

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GST έγινε φασματοφωτομετρικά και βασίστηκε στα πρωτόκολλα (40) και (41), όπως έχουν περιγραφεί από το πρωτόκολλο (42). Η αντίδραση μετράται με παρατήρηση της συμπλοκοποίησης του 1-χλωρο 2,4-δινιτροβενζολίου (CDNB) με τη γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή (GSH). Αυτό γίνεται παρακολουθώντας την αύξηση της απορρόφησης στα 340nm.



Αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer 0,1 M, pH=7.4
2. GSH 1 mM διαλυτοποιημένο σε phosphate buffer
3. CDNB 1 mM διαλυτοποιημένο σε 95% ethanol absolute

Παρασκευή Αντιδραστηρίων:

- Για το Phosphate Buffer (διατηρείται στο ψυγείο):
 - Ζυγίζονται 1,74g K₂HPO₄ και διαλύονται σε 100 ml dH₂O
 - Ζυγίζονται 1,36g KH₂PO₄ και διαλύονται σε 100 ml dH₂O
 - Για παρασκευή 100 ml phosphate buffer αναμιγνύονται 80,2 ml K₂HPO₄ + 19,8 ml KH₂PO₄
 - pH=7,4

- Για την GSH (φωτοευαίσθητο - παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος):
Σε 10 ml phosphate buffer διαλύω 3 mg GSH.

- Για το CDNB (φωτοευαίσθητο - παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος):
Σε 10 ml αιθανόλη διαλύω 2 mg CDNB

Πειραματική διαδικασία (για το σκελετικό μυ):

1. Προετοιμάζουμε τα σωληνάρια erppendorf που απαιτούνται και τα τοποθετούμε σε κλίβανο για 5 λεπτά. Μετά από 5 min τα βγάζουμε από τον κλίβανο και προσθέτουμε τα διαλύματα ως ακολούθως: 880 μl phosphate buffer, 50 μl GSH, 20 μl CDNB
2. Ανακινούμε στο vortex και τα επωάζουμε σε κλίβανο για 5 λεπτά.
3. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο από το κάθε σωληνάριο erppendorf στην κυψελίδα χαλαζία (Quartz) και εκεί προσθέτουμε 50 μl δείγματος.
4. Ανακινούμε με γρήγορες κινήσεις την κυψελίδα έχοντάς την καλυμμένη με parafilm.
5. Καταγράφουμε τη μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340 nm για 3 λεπτά.

Πειραματική διαδικασία (Για το ήπαρ):

1. Προετοιμάζουμε τα σωληνάρια erppendorf που απαιτούνται και τα τοποθετούμε σε κλίβανο για 5 λεπτά. Μετά από 5 min τα βγάζουμε από τον κλίβανο και προσθέτουμε τα διαλύματα ως ακολούθως: 910 μl phosphate buffer, 50 μl GSH, 20 μl CDNB
2. Ανακινούμε στο vortex και τα επωάζουμε σε κλίβανο για 5 λεπτά.
3. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο από το κάθε σωληνάριο erppendorf στην κυψελίδα χαλαζία (Quartz) και εκεί προσθέτουμε 20 μl δείγματος (με αραίωση 1/3).
4. Ανακινούμε με γρήγορες κινήσεις την κυψελίδα έχοντάς την καλυμμένη με parafilm.
5. Καταγράφουμε τη μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340 nm για 3 λεπτά.

Παρατήρηση:

- Σαν τυφλό ετοιμάζουμε ένα σωληνάριο erppendorf και προσθέτουμε phosphate buffer (ρυθμίζουμε την ποσότητα του phosphate buffer ανάλογα με την

ποσότητα του δείγματος, ενώ η ποσότητα της GSH και του CDNB παραμένουν αμετάβλητες) αντί του δείγματος.

Υπολογισμοί:

Υπολογίζουμε τη διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος ανά λεπτό, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta A_{340\text{ nm/min sample}} = (A_{340\text{ nm τελικά}} - A_{340\text{ nm αρχικά}}) / 3\text{ min}$$

όπου A η τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος

Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

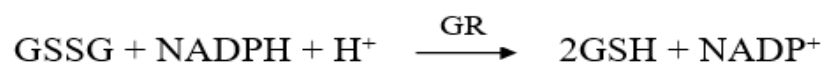
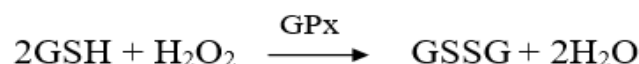
$$\text{GST activity} = [(\Delta A_{340\text{ nm/min sample}} / 0.0096\text{ μM}^{-1}/\text{cm}) \times (1.0\text{ mL} / 0.01\text{ mL}) \times \text{αραίωση δείγματος}] / \text{mg ολικής πρωτεΐνης (U/mg protein)}$$

όπου το 0,0096 ισούται με το συντελεστής μοριακής απόσβεσης του CDNB, 1 ml είναι ο τελικός όγκος στην κυψελίδα και 0,01 ml είναι ο όγκος του κάθε δείγματος.

5.5. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GPx)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GPx έγινε φασματοφωτομετρικά και βασίστηκε στο πρωτόκολλο (43), όπως έχει περιγραφεί από το πρωτόκολλο (42). Η μέτρηση βασίζεται στην παρακολούθηση της οξείδωσης του NADPH. Ειδικότερα, η GSSG που παράγεται από την αναγωγή ενός οργανικού υδροϋπεροξειδίου μέσω της GPx μειώνεται άμεσα και συνεχόμενα από περίσσεια ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) παρέχοντας έτσι μια σταθερή ποσότητα GSH, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση. Η επακολουθούμενη οξείδωση του NADPH προς NADP^+ παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.



Αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffer) 100 mM, pH=7)

M.B. (KH_2PO_4): 136 g/mol, M.B. (K_2HPO_4): 174 g/mol

Για να παρασκευάσουμε 500 ml phosphate buffer φτιάχνουμε 250 ml KH_2PO_4 και 250 ml K_2HPO_4 . Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 6,8 g και τα διαλύουμε σε 250 ml dH_2O . Για το K_2HPO_4 ζυγίζουμε 8,7 g και τα διαλύουμε σε 250 ml dH_2O . Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε 186 mg di-sodium EDTA σε συγκέντρωση 1 mM και ρυθμίζουμε το pH με NaOH ή HCl 1 M μέχρι την τιμή 7.

1. Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH) ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$) M.B.: 307,3 g/mol

Παρασκευάζουμε διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM διαλύοντας 31 mg GSH σε 10 ml dH_2O (παρασκευάζεται φρέσκο την ημέρα του πειράματος).

2. NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$) M.B.: 744,41 g/mol

Παρασκευάζουμε διάλυμα 1,5 mM NADPH σε 0,1% NaHCO_3 διαλύοντας 11,2 mg NADPH και 10 mg NaHCO_3 σε 10 ml dH_2O (παρασκευάζεται φρέσκο την ημέρα του πειράματος).

3. Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR)

Παρασκευάζουμε διάλυμα GR συγκέντρωσης 2,4 U/ml διαλύοντας 10 μl από το εμπορικό στοκ (500 U, 5 mg/ml, 120 U/mg πρωτεΐνης) σε 4990 μl Phosphate buffer.

4. *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH)

Παρασκευάζουμε διάλυμα *t*-BuOOH συγκέντρωσης 12 mM διαλύοντας 5 μl από το *t*-BuOOH διαλύματος εμπορικού στοκ (συγκέντρωσης 6M) σε 2495 μl dH_2O .

Πειραματική διαδικασία

Επωάζουμε το παρακάτω μίγμα για 10 min

	Δείγμα
Phosphate buffer	500 μ l
Ομογενοποιημένος ιστός (αραίωση 1/10)	100 μ l
GR	100 μ l
GSH	100 μ l

Μετά το πέρας των 10 min μεταφέρουμε το μίγμα σε μια κυψελίδα όπου προσθέτουμε 100 μ l NADPH και επωάζουμε για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου (στο στάδιο αυτό καταναλώνετε το NADPH ανεξάρτητα από το υπεροξείδιο). Η εξαρτώμενη από το υπεροξείδιο αντίδραση αρχίζει από τη στιγμή που προσθέτουμε 100 μ l t-BuOOH και παρακολουθούμε τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm για 5 min.

Υπολογισμοί:

Ενεργότητα GPx (U/g ολική πρωτεΐνη) = $0,868 \times \Delta_{\text{abs}} \text{NADPH}_{5\text{min}} / 10 \times 10 \times 10 \times 2$
/ ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης.

Διαιρούμε με το 10, που είναι η συγκέντρωση της GSH (10 mM), πολλαπλασιάζουμε με το 10 λόγω του συντελεστή αραίωσης του δείγματος στην αντίδραση (1000 μ l/100 μ l), πολλαπλασιάζουμε με το 10 για να συμπεριλάβουμε την αραίωση 1/10 του δείγματος και τέλος πολλαπλασιάζουμε με το 2 για να υπολογίσουμε και την αραίωση του δείγματος κατά την διαδικασία της ομογενοποίησης του.

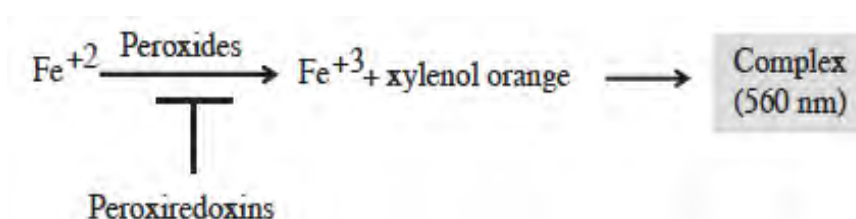
Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης καθορίζεται με την μέθοδο Bradford και εκφράζεται σε mg/mL.

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

5.6. Πρωτόκολλο μέτρησης της ενζυμικής δραστηρότητας της περοξειρεδοξίνης (Prx).

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση της δραστηρότητας της Prx έγινε φασματοφωτομετρικά και βασίστηκε στο πρωτόκολλο (44) όπως έχει περιγραφεί από το πρωτόκολλο (29). Αυτή η μέθοδος παρακολουθεί τη μείωση της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων παρουσία δισθενούς σιδήρου Fe (II) και της χρωστικής πορτοκαλί της ξυλενόλης [xylenol orange, o-cresolsulfonphthalein- 3,3 bis (methylinodiacetic acid sodium salt)]. Σε όξινες συνθήκες τα υπεροξείδια οξειδώνουν τον δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) σε τρισθενή (Fe^{3+}), ο οποίος δημιουργεί ένα σύμπλοκο με το πορτοκαλί της ξυλενόλης. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου παράγει ένα μπλε-μωβ χρώμα με μέγιστη απορρόφηση στα 560nm, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Αντιδραστήρια:

Διθειοθρεϊτόλη (DTT, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, M.B.: 154,25 g/mol)

Για να φτιάξουμε 100 ml DTT 0,167 mM διαλύουμε 2,576 mg DTT σε 100 ml dH_2O .

Υπεροξείδιο (t-BOOH, M.B.: 90,12 g/mol)

Πρώτη αραιώση 1:1000 (30 μl t-BOOH σε 30 ml dH_2O). Δεύτερη αραιώση, προσθέτουμε 649 μl από το διάλυμα της πρώτης αραιώσης έως τα 10 ml dH_2O)

Για να παρασκευάσουμε 10ml διαλύματος αντιδραστήριου FOX,

Αναμιγνύουμε 100 μl αντιδραστήριου FOX A με 9,9 ml αντιδραστήριου FOX B

Αντιδραστήριο FOX A (περιέχει 25 mM ammonium ferrous sulphate αραιωμένο σε 2,5 M θειικό οξύ, το άλας του σιδήρου πρέπει να διαλυθεί απευθείας στο οξύ διότι τα ιόντα σιδήρου είναι επιρρεπή σε αυτοοξειδωση σε φυσιολογικό pH)

Εναμμώνιος θειικός σίδηρος [ammonium ferrous sulphate ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O)],
M.B.: 392,13 g/mol)

Για να φτιάξουμε 1 ml διαλύματος 25 mM διαλύουμε 9,803 mg άλατος σε 1ml θειικού οξέος

Θειικό οξύ (H₂SO₄) M.B.: 98,079 g/mol

Για να φτιάξουμε 1ml 2.5 M θειικού οξέος διαλύουμε 245,198 mg σε 1 ml dH₂O.

Αντιδραστήριο FOX B (περιέχει 100 mM σορβιτόλης and 125 μM πορτοκαλί της ξυλενόλης).

Σορβιτόλη (C₆H₁₄O₆) M.B.: 182,17 g/mol

Για να φτιάξουμε 10 ml 101 mM σορβιτόλης διαλύουμε 183,992 mg σε 10 ml dH₂O.

Πορτοκαλί της ξυλενόλης (C₃₁H₃₂N₂O₁₃S) M.B.: 672,67 g/mol

Για να φτιάξουμε 10 ml 0,126 mM διαλύματος διαλύουμε 0,848 mg στα ίδια 10 ml dH₂O από το παραπάνω διάλυμα.

Πειραματική διαδικασία (για το ήπαρ)

Για κάθε δείγμα ετοιμάζουμε 4 σωληνάρια erpendorf με τα παρακάτω αντιδραστήρια και μια 3αδα δείγματα control σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Control	Δείγμα	Τυφλό (1 σωληνάριο για κάθε δείγμα)
Ομογενοποιημένος ιστός (ήπαρ)	-	20 μl	20 μl
dH ₂ O	20 μl	-	-
DTT	20 μl	20 μl	30 μl
t-BOOH	10 μl	10 μl	-

- Αναμιγνύουμε τα αντιδραστήρια
- Τα αφήνουμε να επωαστούν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Από κάθε δείγμα - σωληνάριο erppendorf προσθέτουμε 50 μl σε 950 μl αντιδραστηρίου FOX
- Κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό οπότε σύμφωνα με τα παραπάνω προσθέτουμε τα 50 μl σε 950 μl αντιδραστηρίου FOX
- Αναμιγνύουμε τα αντιδραστήρια
- Τα αφήνουμε να επωαστούν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Καταγράφουμε την απορρόφηση στα 560 nm

Σημείωση:

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο χρησιμοποιείται σε ορισμένες μεθόδους, δεν προτείνεται για υπόστρωμα στην συγκεκριμένη μέθοδο διότι πολλά ένζυμα (π.χ. η GPx και η καταλάση) το χρησιμοποιούν, επίσης. Αντίθετα, το t-BOOH υπεροξειδίο ανάγεται πολύ πιο αποτελεσματικά από τις περοξειρεδοξίνες παρά από άλλες υπεροξειδάσες.

Υπολογισμοί:

Ενεργότητα Υπεροξειρεδοξινών (U/g Ολικής Πρωτεΐνης) =

$$[(\text{μέσος Control} - \text{Δμέσος δειγμάτων} - \text{τυφλού}) / 267] * (1000/20) * 2$$

Διαιρούμε με το 267 (l/mmol/cm), που είναι ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του σταθερού συμπλόκου του Fe^{3+} με το πορτοκαλί της ξυλενόλης, πολλαπλασιάζουμε με το (1000/20) λόγω της αραίωσης του δείγματος προς τον συνολικό όγκο διαλύματος της κυψελίδας, πολλαπλασιάζουμε με το 2 λόγω της αρχικής αραίωσης που είχε γίνει στο δείγμα κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης, διαιρούμε με την ολική

συγκέντρωση πρωτεΐνης και πολλαπλασιάζουμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα mmol/min σε $\mu\text{mol}/\text{min} = \text{U}$ (U/g Ολικής Πρωτεΐνης).

Πειραματική διαδικασία (για τον μυ)

Για κάθε δείγμα ετοιμάζουμε 4 σωληνάρια erppendorf με τα παρακάτω αντιδραστήρια και μια 3αδα δείγματα control σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Control	Δείγμα	Τυφλό (1 σωληνάριο για κάθε δείγμα)
Ομογενοποιημένος ιστός (μυς σε αραιώση 1:2)	-	10 μl	10 μl
dH ₂ O	10 μl	-	-
DTT	30 μl	30 μl	30 μl
t-BOOH	10 μl	10 μl	-

- Αναμιγνύουμε τα αντιδραστήρια
- Τα αφήνουμε να επωαστούν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Από κάθε δείγμα - σωληνάριο erppendorf προσθέτουμε 50 μl σε 950 μl αντιδραστηρίου FOX
- Κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό οπότε σύμφωνα με τα παραπάνω προσθέτουμε τα 50 μl σε 950 μl αντιδραστηρίου FOX
- Αναμιγνύουμε τα αντιδραστήρια
- Τα αφήνουμε να επωαστούν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
- Καταγράφουμε την απορρόφηση στα 560 nm

Υπολογισμοί:

Ενεργότητα Υπεροξυρεδοξινών (U/g Ολικής Πρωτεΐνης) =

$$[(\text{μέσος Control} - \text{Διμέσος δειγμάτων} - \text{τυφλού}) / 267] * (1000 / 20) * 2 * 2$$

Διαιρούμε με το 267 (l/mmol/cm), που είναι ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του σταθερού συμπλόκου του Fe^{3+} με το πορτοκαλί της ξυλενόλης, πολλαπλασιάζουμε με το (1000/20) λόγω της αραίωσης του δείγματος προς τον συνολικό όγκο διαλύματος της κυψελίδας, πολλαπλασιάζουμε με το 2 λόγω 1/2 αραίωσης του δείγματος, πολλαπλασιάζουμε με το 2 λόγω της αρχικής αραίωσης που είχε γίνει στο δείγμα κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης, διαιρούμε με την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης και πολλαπλασιάζουμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα mmol/min σε $\mu\text{mol}/\text{min}=\text{U}$ (U/g Ολικής Πρωτεΐνης).

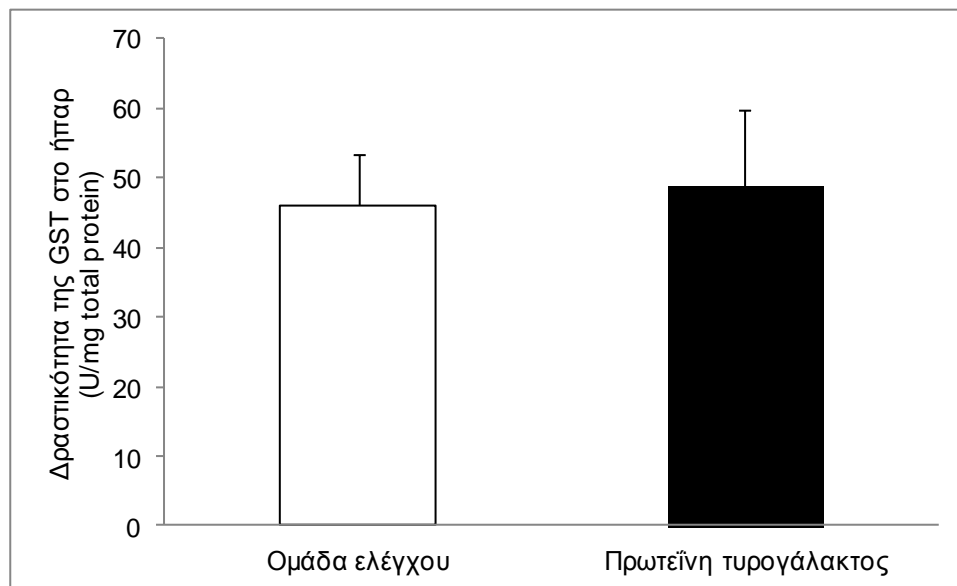
Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SD}$.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. Δραστικότητα της GST στο ήπαρ

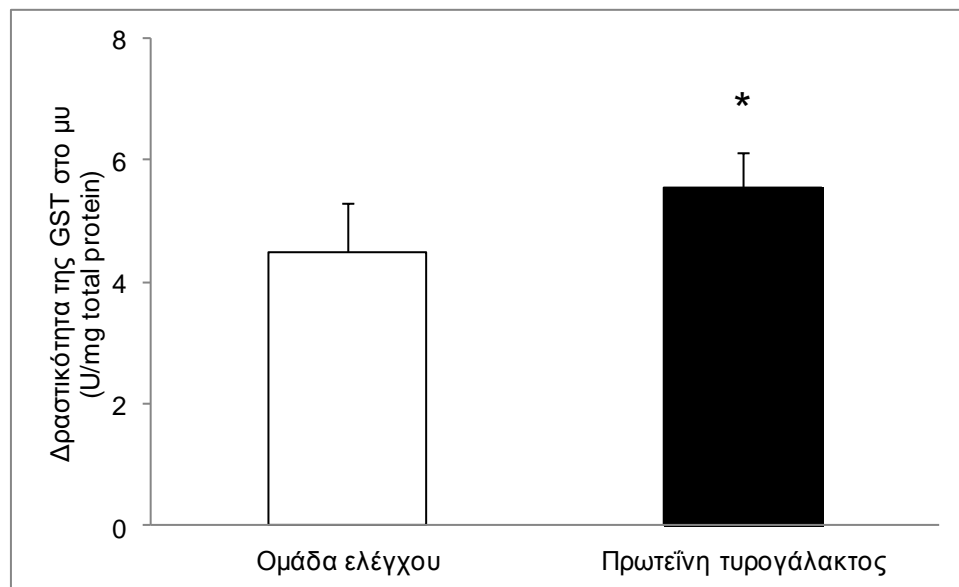
Δεν παρατηρούμε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της GST στο ήπαρ.



Γράφημα 1. Η δραστικότητα της GST στο ήπαρ.

6.2. Δραστικότητα της GST στον τετρακέφαλο μυ

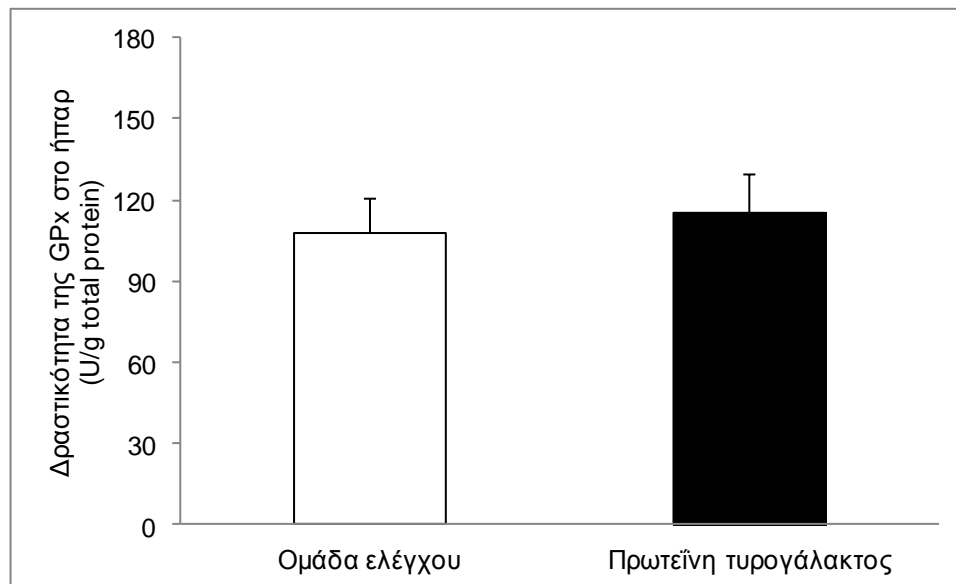
Παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της GST στην ομάδα πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Γράφημα 2. Η δραστικότητα της GST στον τετρακέφαλο μυ.

6.3. Δραστικότητα της GPx στο ήπαρ

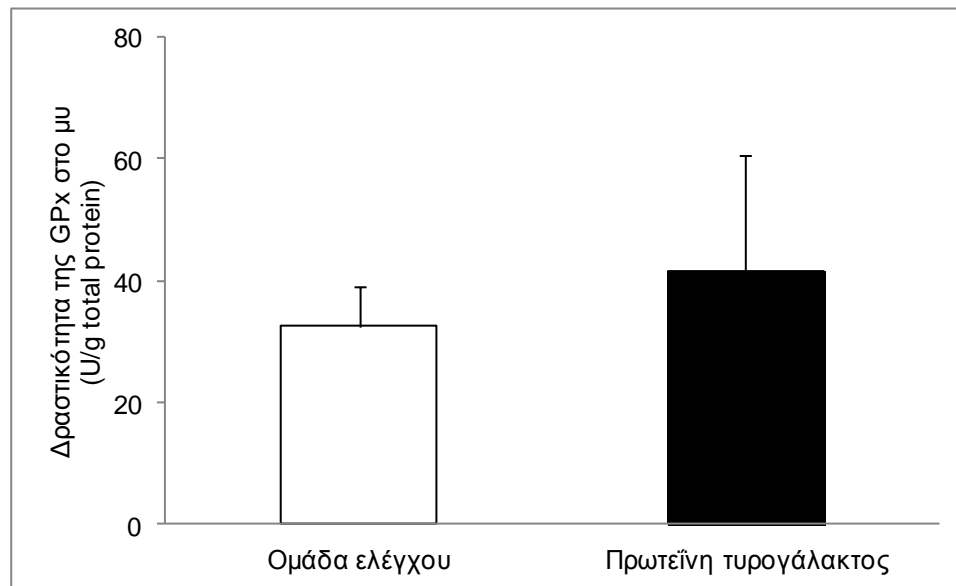
Δεν παρατηρούμε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της GPx στο ήπαρ.



Γράφημα 3. Η δραστικότητα της GPx στο ήπαρ.

6.4. Δραστικότητα της GPx στο σκελετικό μυ

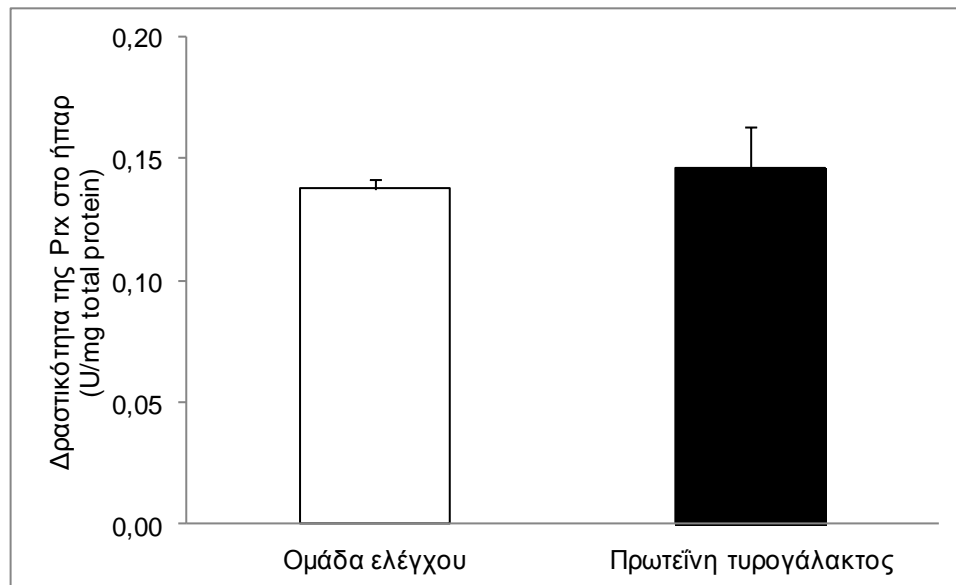
Παρατηρούμε μια μικρή τάση αύξησης της δραστικότητας της GPx στην ομάδα πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς όμως αυτή η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική.



Γράφημα 4. Η δραστικότητα της GPx στο σκελετικό μυ.

6.5. Δραστικότητα της Prx στο ήπαρ

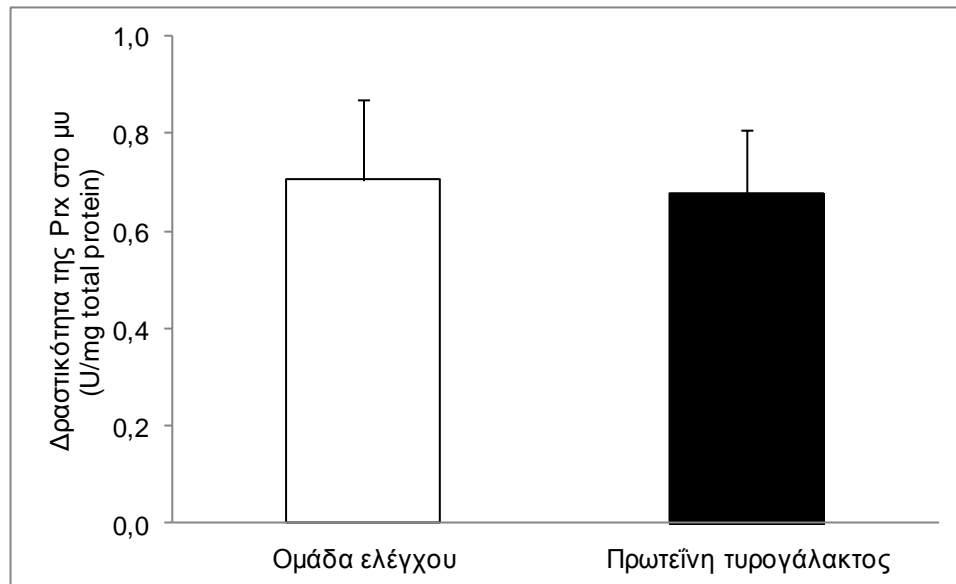
Δεν παρατηρούμε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της Prx στο ήπαρ.



Γράφημα 5. Η δραστικότητα της Prx στο ήπαρ.

6.6. Δραστικότητα της Prx στο σκελετικό μυ

Δεν παρατηρούμε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της Prx στο σκελετικό μυ.



Γράφημα 6. Η δραστικότητα της Prx στο σκελετικό μυ.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στο σκελετικό μυ και το ήπαρ επιμύων, οι οποίοι την κατανάλωσαν για 28 ημέρες. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η επίδρασή της στη δραστηριότητα μιας ομάδας τριών ενζύμων [τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και περοξειρεδοξίνη (Prx)] τα οποία έχουν ως φυσιολογικό ρόλο να αντιδρούν με υπεροξειδία (κυρίως αυτό του υπεροξειδίου του υδρογόνου αλλά και άλλα) και να τα εξουδετερώνουν. Με βάση τα αποτελέσματα, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της GST στο μυ καταδεικνύοντας τη σημαντική προστατευτική της δράση έναντι των επιβλαβών υπεροξειδίων. Παράλληλα, εμφανίστηκαν μικρές τάσεις αύξησης στην GST στο ήπαρ και στην GPx και στους δύο ιστούς, ενώ η Prx δεν επηρεάστηκε.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των σχετικών δημοσιεύσεων της βιβλιογραφίας, ο ρόλος της πρωτεΐνης τυρογάλακτος έχει αναβαθμιστεί από το παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής τυριού, ως ένα νέο προϊόν με υψηλή διατροφική αξία. Αποτελεί ένα εν δυνάμει βιολειτουργικό τρόφιμο και ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την αύξηση της γλουταθειόνης μέσω τροφοδοσίας των κυττάρων με το αμινοξύ κυστεΐνη (35). Επίσης, προμηθεύει τα κύτταρα με θειολικές ομάδες που περιέχονται στις κυστεΐνες και χρησιμεύουν ως αναγωγικοί παράγοντες (38).

Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια μίας ευρύτερης μελέτης που έχει πραγματοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα και από την οποία έχουν προκύψει ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ενίσχυσε την αντιοξειδωτική άμυνα των περισσότερων ιστών επιμύων που εξετάστηκαν, και ιδιαίτερα του τετρακέφαλου μυός και του ήπατος που μελετήθηκαν και εδώ, καθώς αύξησε την ανηγμένη γλουταθειόνη και μείωσε τις ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (βιοδείκτης οξειδωσης λιπιδίων) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (βιοδείκτης οξειδωσης πρωτεϊνών) (33). Οπότε, σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή την εργασία, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων στους ιστούς λόγω της ενεργοποίησης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού από την πρωτεΐνη τυρογάλακτος με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών (GST, GPx, Prx).

Επίσης, σύμφωνα με μια άλλη μελέτη κατά την οποία χορηγήθηκε πρωτεΐνη τυρογάλακτος και H_2O_2 σε μυοβλάστες ποντικού C2C12 βρέθηκε ότι στις καλλιέργειες οι οποίες είχαν αναπτυχθεί παρουσία της πρωτεΐνης τυρογάλακτος ότι η συγκέντρωση της γλουταθειόνης και η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάση (CAT), σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και GPx αυξήθηκε. Ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος οδήγησε στην ανάπτυξη των κυττάρων ακόμα και παρουσία H_2O_2 (45). Επιπλέον, σε μια άλλη σχετική μελέτη, η οποία έγινε σε κύτταρα PC12 φαιοχρωμοκυττώματος επιμύων εξετάστηκαν οι προστατευτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης τυρογάλακτος με την εξής μεθοδολογία (46). Εφάρμοσαν για 2 ώρες διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε καλλιέργειες και στη συνέχεια άφησαν τα κύτταρα να αναπτυχθούν παρουσία H_2O_2 για 24 ώρες. Μέτρησαν το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων καθώς και βιοδείκτες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH και ανιόν σουπεροξειδίου καθώς και το αναγωγικό δυναμικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης τυρογάλακτος εφαρμόστηκε, τόσο μεγαλύτερα ήταν τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες και σε κάποιες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων κατά 20%-30%. Επίσης, σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν μετά από μέτρηση και των υπόλοιπων βιοδεικτών. Τελικά, φάνηκε εκ νέου ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει ιδιαίτερα ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Σε μια ακόμη έρευνα ανθρώπινα κύτταρα MRC-5 πνευμονικών ινοβλαστών, καλλιεργήθηκαν παρουσία πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε διάφορες συγκεντρώσεις και έπειτα παρουσία H_2O_2 μετρήθηκε πάλι η ικανότητα επιβίωσης των κυττάρων, καθώς η δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT, GPx) (47). Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της θνησιμότητας των κυττάρων όταν σε αυτά είχαν προστεθεί στο θρεπτικό τους υλικό υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης τυρογάλακτος (σε σχέση με τους μάρτυρες που δεν είχε προστεθεί καθόλου). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης πιθανώς λόγω της αύξησης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT, GPx. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα δικά μας αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ενισχύει τη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Επιπρόσθετα, σε μια άλλη έρευνα χορηγήθηκε από το στόμα πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε 24 ποντίκια για τέσσερις ημέρες και στη συνέχεια παρακεταμόλη σε μεγάλη συγκέντρωση για δύο μέρες ώστε να προκληθεί οξειδωτικό στρες και εκτιμήθηκε η δράση αντιοξειδωτικών

ενζύμων (48). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος λειτούργησε προστατευτικά για τα κύτταρα του ήπατος έναντι του επαγόμενου από την παρακεταμόλη οξειδωτικού στρες, αφού παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και GPx ενώ επίσης παρατηρήθηκε μείωση των TBARS. Επιπρόσθετα, σε άλλη μελέτη συσχετίστηκε η πρωτεΐνη τυρογάλακτος με τα επίπεδα κόπωσης και οξειδωτικού στρες σε ποντίκια μετά από έντονη άσκηση (κολύμπι) μετρώντας την ενζυμική δραστηριότητα της SOD και της GPx στο γαστροκνήμιο μυ (49). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία αλλαγή στη δραστηριότητα της SOD αλλά παρουσιάστηκε αύξηση στη δραστηριότητα της GPx, ενδεικτικό στοιχείο του ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτίωσε την αντιοξειδωτική άμυνα του μυός μετά την επαγωγή οξειδωτικού στρες από έντονη άσκηση. Τέλος, σε μια άλλη έρευνα στην οποία εξέτασαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε ποντίκια, στα οποία προκλήθηκε οξειδωτικό στρες μέσω πρόσληψης από του στόματος μεγάλης ποσότητας σιδήρου, τα αποτελέσματα ήταν επίσης ενθαρρυντικά (50). Παρατηρήθηκε αύξηση των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα, αύξηση της δραστηριότητας της SOD και της GSH στα ερυθροκύτταρα, μείωση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, ενώ στην δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx, CAT και GST δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή. Άρα και μέσω αυτής της μελέτης καταδεικνύονται οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης ορού γάλακτος, όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δείχνουν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτίωσε την άμυνα των ιστών που εξετάστηκαν απέναντι στα υπεροξείδια στο βαθμό που αυτό απαιτούνταν. Το παρόν πείραμα αποτελεί κομμάτι μίας μεγαλύτερης πειραματικής παρέμβασης του εργαστηρίου μας, τα αποτελέσματα της οποίας καταδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στους κυριότερους ιστούς επιμύων. Αυτό σημαίνει ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί της πρώτης γραμμής άμυνας (π.χ. καταλάση, γλουταθειόνη) ενισχύθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε τα ένζυμα που μετρήσαμε σε αυτή τη μελέτη να μην υπάρχει ανάγκη να ενεργοποιηθούν περαιτέρω. Τελικά, σε συνδυασμό και με ευρήματα άλλων σχετικών μελετών φαίνεται ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος είναι ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο προϊόν, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιοξειδωτική ενίσχυση του οργανισμού και να πάψει να αποτελεί ρύπο για το περιβάλλον.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988 Mar;5(3):156–70.
2. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 1999;13(3):295–309.
3. Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones.* 2012 Jan;17(1):11–21.
4. Di Meo S VP. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept.* 2001;10:125–40.
5. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527–605.
6. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994 Jan;74(1):139–62.
7. Klebanoff S. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman R, editor. *Inflamm basic Princ Clin Correl.* 1988;391– 444.
8. Koren HS. Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect.* 1995 Sep;103(suppl 6):235–42.
9. Victorin K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res Genet Toxicol.* 1994 Feb;317(1):43–55.
10. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci.* 1998 Sep;43(9 Suppl):30S–34S.
11. Ray RS, Mehrotra S, Shankar U, Babu GS, Joshi PC, Hans RK. EVALUATION OF UV-INDUCED SUPEROXIDE RADICAL GENERATION POTENTIAL OF SOME COMMON ANTIBIOTICS. *Drug Chem Toxicol.* 2001 Jan 31;24(2):191–200.

12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA; 2015.
13. Ames BN. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. A.R. Liss; 1986.
14. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand*. 2001 Mar;171(3):233–9.
15. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 2001 Feb;90(2):724–31.
16. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec;222(3):283–92.
17. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2002 Apr;30(2):280–5.
18. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*. 2002 Dec;1(2):117–23.
19. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):358–62.
20. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 May 1;32(9):790–6.
21. Radák Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, et al. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;72(3):189–94.
22. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291–5.
23. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep;8(9–10):1865–79.
24. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc*. 1988 Feb;20(1):55–9.
25. Culotta VC, Yang M, O'Halloran T V. Activation of superoxide dismutases:

- Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006 Jul;1763(7):747–58.
26. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002 Nov;33(9):1260–7.
 27. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1–16.
 28. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016 Jan;39(1):1–5.
 29. Veskoukis AS, Margaritelis N V., Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Rep.* 2018 Jan 31;23(1):47–56.
 30. Gill HS, Rutherford-Markwick K, Cross ML. Bovine milk: A unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. Vol. 248, *Roy Soc Ch.* 2000. 82-90 p.
 31. Bucci, I.R., Unlu IM. Proteins and amino acid supplements in exercise and sport. *CRC Press.* 1999;191–212.
 32. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23;94(26):14930–5.
 33. Kerasioti E, Stagos D, Tsatsakis A, Spandidos D, Taitzoglou I, Kouretas D. Effects of sheep/goat whey protein dietary supplementation on the redox status of rats. *Mol Med Rep.* 2018 Feb 20;17(4):5774–81.
 34. BULUT SOLAK B, Akin N. Health Benefits of Whey Protein: A Review. Vol. 2, *Journal of Food Science and Engineering.* 2012. 129-137 p.
 35. Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002 Jul;42(4):353–75.

36. Bounous G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20(6C):4785–92.
37. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev.* 2004 Jun;9(2):136–56.
38. Marz R. *Medical Nutrition from Marz.* 2nd ed. Po. OR: Omni Press; 2002.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72(1–2):248–54.
40. Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 1981;77:398–405.
41. Evelo CT, Palmen NG, Artur Y, Janssen GM. Changes in blood glutathione concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1992;64(4):354–8.
42. Veskoukis AS, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers.* 2016 Apr 2;21(3):208–17.
43. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114–21.
44. Nelson KJ, Parsonage D. Measurement of Peroxiredoxin Activity. *Curr Protoc Toxicol.* 2011 Aug;Chapter 7:Unit7.10.
45. Xu R, Liu N, Xu X, Kong B. Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J Dairy Sci.* 2011 Aug 1;94(8):3739–46.
46. Zhang Q-X, Ling Y-F, Sun Z, Zhang L, Yu H-X, Kamau SM, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol Lett.* 2012 Nov 4;34(11):2001–6.
47. Kong B, Peng X, Xiong YL, Zhao X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chem.*

2012 Nov 15;135(2):540–7.

48. Athira S, Mann B, Sharma R, Kumar R. Ameliorative potential of whey protein hydrolysate against paracetamol-induced oxidative stress. *J Dairy Sci.* 2013 Mar;96(3):1431–7.
49. Liu J, Wang X, Zhao Z. Effect of whey protein hydrolysates with different molecular weight on fatigue induced by swimming exercise in mice. *J Sci Food Agric.* 2014 Jan 15;94(1):126–30.
50. Kim J, Paik H-D, Yoon Y-C, Park E. Whey protein inhibits iron overload-induced oxidative stress in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2013;59(3):198–205.